



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA



茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2000 年 12 月 27 日
Application Date

申請案號：089128027
Application No.

申請人：財團法人工業技術研究院
Applicant(s)

局長
Director General

陳明邦

發文日期：西元 2001 年 3 月 7 日
Issue Date

發文字號：
Serial No. 09011003303

申請日期： 89.12.27

案號： 89128027

類別： 發明

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、 發明名稱	中文	新穎之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白
	英文	
二、 發明人	姓名 (中文)	1. 周民元 2. 呂長益
	姓名 (英文)	1. CHOU, MIN-YUAN 2. LEU, CHARNG-YIH
	國籍	1. 中華民國 2. 中華民國
	住、居所	1. 台北縣新店市安民街65巷15號8樓之1 2. 台北縣新店市太平路17巷8號
三、 申請人	姓名 (名稱) (中文)	1. 財團法人工業技術研究院
	姓名 (名稱) (英文)	1.
	國籍	1. 中華民國
	住、居所 (事務所)	1. 新竹縣竹東鎮中興路四段一九五號
	代表人 姓名 (中文)	1. 林信義
	代表人 姓名 (英文)	1.



四、中文發明摘要 (發明之名稱：新穎之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白)

本發明揭露一種新穎之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，以及有關於此膠原蛋白的核酸序列、蛋白質序列、載體構築及轉形株。

英文發明摘要 (發明之名稱：)



本案已向

國(地區)申請專利

申請日期

案號

主張優先權

無

有關微生物已寄存於

寄存日期

寄存號碼

食品工業發展研究所

2000/11/14

CCRC 940331



五、發明說明 (1)

發明領域

本發明係有關於一種新穎之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，以及編碼此新穎膠原蛋白的核酸序列，特別是有關於此新穎膠原蛋白的核酸序列之載體構築及其表現。

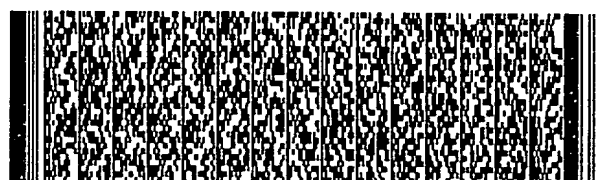
發明背景

膠原蛋白 (collagen) 是一種結構蛋白，組成各種細胞外間質的聚合物，主要是以不溶性纖維蛋白的形式存在。膠原蛋白多胜肽包含一種或多種的 (甘氨酸-x-y) 重複，其中x代表任何的胺基酸，y通常代表脯胺醯基 (prolyl) 或羥基脯胺醯基殘基。這樣的重複序列使得三組膠原蛋白多胜肽可折疊成堅固及不能擴展的三螺旋結構 (triple-helical structure)。

目前在脊椎動物中，已鑑定出有19種不同的膠原蛋白，係由超過30種基因所編碼；這些蛋白質顯示出相當高度的歧異性，包括大小、序列、組織分布、分子組成份等，每一種膠原蛋白在結締組織中都扮演不同的結構角色。

在膠原蛋白的超家族中，可將其區分為兩類：(1) 纖維絲膠原蛋白家族，包括第I、II、III、IV、V及VI型膠原蛋白；(2) 非纖維絲膠原蛋白家族

(fibril-associated collagens with interrupted triple helices; FACIT)，包括第IX、XII、XIV、XVI及XIX型膠原蛋白。非纖維絲膠原蛋白的分子結構，包括兩



五、發明說明 (2)

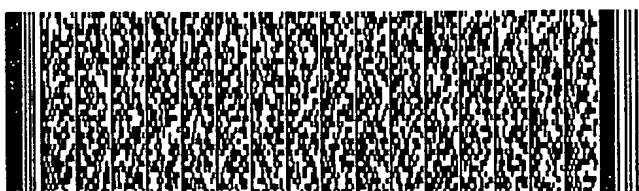
種或多種相當短的三螺旋 (COL) 功能部位，並與非三螺旋 (NC) 的序列相連。第IX型膠原蛋白在這類分子中最具代表性。

膠原蛋白是典型的嵌合型蛋白質，含有許多混雜的功能部位 (domain)，這些功能部位藉由序列相似性而分類，以定性與其他蛋白質之結構及功能上的關係。此分析提供膠原蛋白同源性的概觀，並也顯示以下兩種新的關係：(1) 存在於第V、IX、XI及XII型膠原蛋白的序列，是同源於凝血因子 (thrombospondin) 中的肝素 (heparin) 結合部位；(2) 在人類第VII型膠原蛋白中，其胺基端的球蛋白功能部位包含第III型纖維網蛋白 (fibronectin) 重複，其相鄰於A型偉勒布業德因子 (von Willebrand factor type A; vWF)。

凝血因子 (thrombospondin) 是一種黏性的醣蛋白，負責調節細胞-細胞及細胞-間質之間的交互作用。其在細胞外的間質表現，與血小板凝集、胚胎形成、形態形成、細胞黏附分子及轉形生長因子 ($TGF \beta_1$) 的活化有關。而偉勒布業德因子則存在於基質補體因子、整合素

(integrins)、膠原蛋白及其他的細胞外蛋白質中。具有偉勒布業德因子的蛋白質通常是與細胞黏附、移動、導引、類型形成及訊息傳遞等的生物機轉有關。

由於膠原蛋白是生醫材料的重要建材，主要包括使組織生長、整型、燒燙傷敷料、傷口癒合等功能，並且市場規模不斷地擴大，因此，開發更具有醫療價值及更多樣性



五、發明說明 (3)

的膠原蛋白及其衍生物，以應用於各種用途，即是現今研發者所欲解決的課題。

本發明的發明人利用已知的人類表現序列標籤 (EST) 資料庫，結合生物資訊學 (bioinformatics) 及分子選殖技術，成功地選殖出一種新穎的人類膠原蛋白基因；經過與目前已知的19種膠原蛋白比對後，其最高的序列同源性不超過30%，顯示其為完全新穎之膠原蛋白。

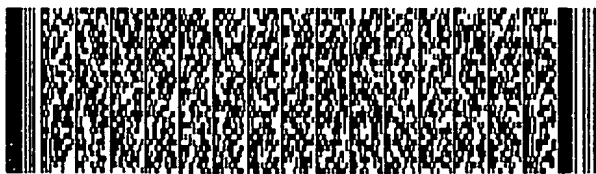
發明概述

本發明提供一種編碼人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白之分離的核酸分子 (hCOLA1) 及其簡併序列 (degenerate sequences)，其包括如序列辨識編號：5之核苷酸序列 (請參見說明書結尾的序列表)，以及衍生自序列辨識編號：5之片段，以作為核酸探針及引子。

在一較佳具體實施例中，本發明提供一種人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白，具有序列辨識編號：1所示之胺基酸序列，其係由上述之核酸分子所表現。

本發明的另一形態是提供一種重組載體，其包括上述之核酸分子以及一調控序列。

本發明的又一形態係提供一種表現人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白的方法，包括：(a) 將上述重組載體轉形或轉染至一宿主細胞中 (例如，原核或真核細胞)；(b) 在一適當條件下培養該轉形或轉染的宿主細胞，以使其表現人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白；以及(c) 純化及回收該人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白。



五、發明說明 (4)

仍是本發明的的另一形態是提供一種檢驗試劑，其可用於在人類或哺乳動物體內，偵測與序列辨識編號：5之核酸序列突變有關之疾病，此檢驗試劑包括如上所述之核酸探針或引子，以用於偵測該疾病。

為了讓本發明之上述和其他目的、特徵，及優點能更明顯易懂，下文特舉較佳實施例並配合所附圖示，做詳細說明如下：

圖示簡單說明

第1圖係顯示以聚合鏈鎖反應(PCR)所選殖的人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白cDNA之結果；其中，第1道為DNA標記；第2道為不含人類cDNA之陰性對照組；以及第3道為含有編碼人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白cDNA之PCR產物。

第2圖係顯示本發明重組載體Bluescript KS(+)/*E. coli* (hCOLA1)之構築。

第3圖係顯示本發明之新穎人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白的完整核苷酸序列(序列辨識編號：5)，及其對應之胺基酸序列(序列辨識編號：1；以單一字母代表)。

第4圖係顯示推導的人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白之胺基酸序列，經由Kyte-Doolittle疏水性分析所繪製的疏水性分布圖。

第5圖係顯示本發明之新穎人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白的功能部位結構示意圖。

第6圖係顯示：(A) 以509 鹼基對(bp)長度的序列



五、發明說明 (5)

辨識編號：5 (核苷酸1236-1845) 為探針，對人類各部位組織樣品之北方墨漬圖；以及(B) β -肌動蛋白作為內部對照組。

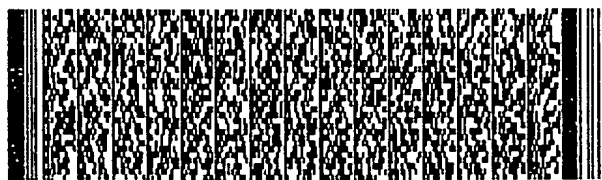
第7圖係顯示：(A) 在大腸桿菌中所表現之新穎人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，經由硫酸十二酯鈉-聚丙烯醯胺電泳(SDS-PAGE)分析之結果，其中，左側數字為分子量標記；第1道為未誘導的細胞溶胞物；第2道係以IPTG誘導2小時；以及第3道係以IPTG誘導3小時之細胞溶胞物；以及(B) 第1道：經由鎳-瓊脂糖管柱層析純化後之蛋白以SDS-PAGE分析並以考馬斯藍染色；第2、3道：以抗組織胺酸抗體偵測之西方墨漬圖；其中第2道為未誘導之細胞溶胞物；第3道為經IPTG誘導2小時但未純化之細胞溶胞物。

第8圖係顯示在COS7細胞中，人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白基因之表現的RT-PCR結果；其中，"-"為陰性對照組；以及"+"為含有人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白基因轉形之細胞的RT-PCR產物；左側數字為DNA標記。

第9(A)-(C)圖係顯示本發明之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白(hCOLA1)與第IX型(Col9a1)及XIX型(Col19a1)膠原蛋白的蛋白質序列比對，其中，黑色框代表完全相同之胺基酸殘基，符號"-"代表最佳比對條件下之空白間隔；第9(C)圖下方為此三種膠原蛋白之演化樹狀圖。

發明詳述

本發明從目前已知的人類表現序列標籤(EST)資料



五、發明說明 (6)

庫中，篩選已知膠原蛋白核酸序列中，保守性最高的區域，再將該序列送入至人類EST資料庫中搜尋，找出蛋白質一級結構相似性最高的新分子，並結合生物資訊學及分子選殖技術，而獲得全長的互補去氧核糖核酸 (cDNA) 序列。

首先，選擇大約57個鹼基對的保守性區域，經EST資料庫比對後，得到大約長300個鹼基對的片段，再將其送入基因資料庫 (Genbank Blast) 搜尋人類非重複 (non-redundant) 基因，得到大小約146仟鹼基對 (kb) 含有表現序列 (exon) 及插入序列 (intron) 之片段；再經比對，找到可能的開放譯讀架構 (open reading frame)，並以此設計相關的核酸引子，進而選殖出此段全長之新穎的人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白基因。其選殖方法，將在以下的實施例中詳細說明。

本發明所獲得的全長人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白 (hCOLA1) 基因，其核苷酸序列 (序列辨識編號：5) 及所編碼的胺基酸序列 (序列辨識編號：5) 如第3圖所示。此新穎之人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白基因包含2,865個鹼基對，其編碼954個胺基酸，分子量約為99,000道耳吞 (Da)，且位於人類的第6號染色體之p11.2-12.3上。

上述所分離之核酸分子 (hCOLA1基因)，至少包括如序列辨識編號：5之核苷酸序列 (包括DNA及RNA序列) 或其互補序列，以及基因體DNA (genomic DNA) 序列；如同熟悉分子生物學領域之人士所了解，可使用任何在此技藝

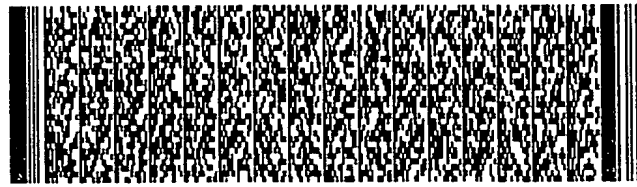


五、發明說明 (7)

中所熟知之方法而將核苷酸序列作稍微的修飾。例如，可利用簡併密碼 (degenerate codons) 取代序列上的相關位置，但仍編碼相同的胺基酸序列。此外，也可在3'端或5'端或序列中插入附加的密碼，但不影響或僅稍微影響所編碼的蛋白質之活性，因此，序列辨識編號：1之互補序列、簡併序列及上述之各種修飾變異體，也是在本發明的範疇之內。這些基因工程的方法可參見Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989。

根據本發明所分離之hCOLA1基因，其編碼的人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白可包括三個功能部位（如第5圖所示），分別是：(i) 偉勒布業德因子功能部位（具有如序列辨識編號：2所示之胺基酸序列）；(ii) 類-凝血因子胺基端功能部位（具有如序列辨識編號：3所示之胺基酸序列）；以及(iii) 膠原蛋白功能部位（具有如序列辨識編號：4所示之胺基酸序列）。分析此蛋白的一級結構，並與目前所發現的其他19種膠原蛋白作比較，本發明之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白是屬於FACIT家族之膠原蛋白。由上述這些功能部位可推測本發明之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，其生理功能可能與血小板凝集、細胞黏附及轉形生長因子

(transformation growth factor) 的活化有關有關。此外，在此膠原蛋白的胺基端，更包含一段長度為22個胺基酸的訊號胜肽，可推測本發明之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白應位於細胞外的間質。



五、發明說明 (8)

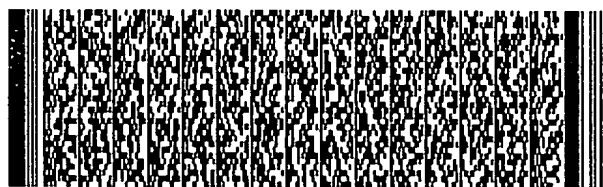
本發明也提供一種重組載體，其包括上述所選殖之分離的核酸分子，以及可視需要地包括一調控序列，例如，載體複製區、篩選標記（例如，抗生素標記）、啟動子等，其中啟動子可以是真核細胞或原核細胞的基因轉錄啟動子，以使得此重組載體可在適當的真核（例如，哺乳動物細胞或酵母菌）或原核（例如，大腸桿菌）宿主中表現。

在一較佳具體實施例中，本發明提供一重組載體，係將hCOLA1基因選殖到Bluescript KS(+)載體中 (Strategen)，命名為Bluescript KS(+)

/Escherichia coli DH5 α (hCOLA1)，並於中華民國89年11月14日寄存於食品工業發展研究所菌種中心（台灣，新竹），寄存編號為CCRC 940331。

利用本發明上述分離之核酸分子，熟悉於此技藝者可藉由任何適當的方式而使此核酸分子表現，以生產此新穎之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，其具有序列辨識編號：1所示之胺基酸序列。因此，生產hCOLA1膠原蛋白之方法也是包括在本發明的範疇之內。

在一較佳具體實施例中，本發明將序列辨識編號：5之核酸分子轉形或轉染進入一表現載體中，以得到一重組載體；然後將該重組載體導入至一適當之宿主細胞中（例如，原核或真核細胞）；並在足以產生hCOLA1膠原蛋白的條件下，培養該轉形或轉染的宿主細胞；最後，純化及回收所表現的hCOLA1膠原蛋白。純化及回收的步驟並無特別



五、發明說明 (9)

的限制，且為熟悉於此技藝者所能了解，例如，利用各種管柱層析進行；較佳地，係利用組織胺酸標籤

(Histidine Tag) 的融合技術表現hCOLA1膠原蛋白，並利用親和性管柱層析而分離純化。

此處所使用的名詞"轉染"或"轉形"，包括各種用以將一外源性核酸序列導入至細胞(例如，原核或真核細胞)的技術，包括磷酸鈣或氯化鈣沈澱、微注射

(micro-injection)、DEAE-糊精-媒介的轉染、脂轉染(lipofection)或電轉殖(electroporation)。

電轉殖可在大約的電壓及電容(以及相對應的時間常數)之下進行，以導致DNA構築進入至細胞。電轉殖可在一廣範圍的電壓(例如，50到2000伏特)及對應的電容之下進行。一般是使用大約0.1到500微克的總DNA量。

磷酸鈣沈澱、修飾的磷酸鈣沈澱及可魯比因(colubrine)沈澱、脂質體融合及受體媒介的基因傳遞等方法，也可用於轉染細胞。

以上有關基因工程的方法，例如，DNA修飾、重組載體的選殖、構築及分離、蛋白質表現及回收純化等，都可由熟悉於此技藝之人士所完成，並可參見Ausubel, F. M., et al., Current Protocols in Molecular Biology, New York, 1992; Sambrook, et al., 上述文獻；或Davis, L. G., Methods in Molecular Biology, Elsevier, Amsterdam, NL, 1986。

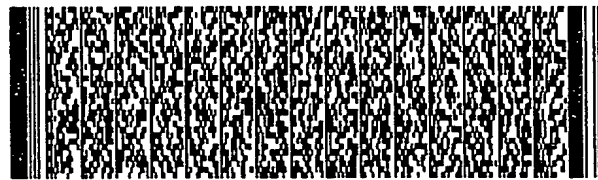
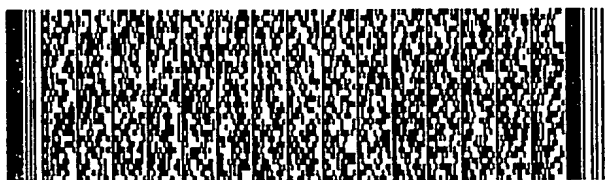
在本發明的另一形態中，分離的核酸分子更包括衍生



五、發明說明 (10)

自序列辨識編號：5之片段，以作為核酸探針（probe）及引子（primer），此核酸片段的長度並無特定的限制，且為熟悉於此技藝者所能了解，例如，作為核酸探針的片段，其長度較佳為包括序列辨識編號：5的500個核苷酸或更長；作為核酸引子的片段，其長度較佳為包括序列辨識編號：5的20個核苷酸或更長。選擇上述核酸片段的長度，須考慮進行偵測步驟（如下所述）之反應條件，例如，雜交反應（hybridization）的溫度及離子強度等；或是PCR增殖反應（amplification）的溫度等。這些考慮係熟悉於分子選殖技術之人士所能了解。一般而言，核酸探針的長度是與偵測結果的專一性成正相關。因此，較佳地，核酸探針的長度是序列辨識編號：5之至少500個核苷酸長度，更佳地，是全長的序列辨識編號：5之長度，藉此增加偵測結果的專一性。此外，核酸引子的長度也是與偵測結果的專一性成正相關。較佳地，核酸引子的長度是序列辨識編號：5之至少20個核苷酸長度，更佳地，是序列辨識編號：5之20-25個核苷酸長度，藉此增加偵測結果的專一性。

本發明更提供一種檢驗試劑，其可用於在人類或哺乳動物體內，偵測與序列辨識編號：5之核酸序列突變有關之疾病，例如，類風濕性關節炎、骨關節炎、反射性關節炎、自體免疫聽覺疾病、細菌或病毒感染所引起的軟骨發炎（例如，萊姆症）、寄生蟲性疾病、黏液囊炎、角膜症狀及關節黏連脊椎炎等。

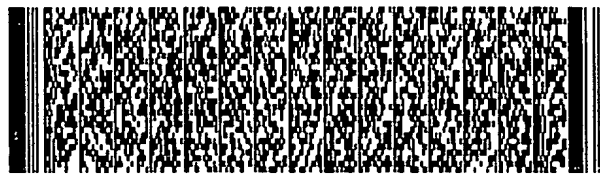


五、發明說明 (11)

本發明的檢驗試劑包括如上所述之核酸探針或引子，以用於偵測與序列辨識編號：5之核酸序列突變有關之疾病。利用本發明之核酸探針，以偵測hCOLA1膠原蛋白基因表現的方法包括，但並不限於，北方墨漬法 (Northern blot)、南方墨漬法 (Southern blot)、原位雜交法 (*in situ* hybridization)、生物微陣列晶片等，熟悉於此技藝者當可了解，任何利用核酸分子互補特性的方法，均可以作為本發明的應用方法。可利用本發明之核酸引子，以偵測hCOLA1膠原蛋白表現的方法包括，但並不限於，反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)、5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End)、3'-RACE等；熟悉於此技藝者當可了解，任何利用本發明之核酸引子配合聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 的方法，均是在本發明的範疇之內。

本發明所提供之人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白亦可作為醫療使用，例如，基因療法。例如，可將此新穎之膠原蛋白基因製成一重組質體，配合一適當的基因載體及/或宿主細胞，而將此基因送入具有與序列辨識編號：5之核酸序列突變有關之疾病的哺乳動物 (包括人類)，取代或置換原本有缺陷的體內基因，以表現出正常形式的膠原蛋白。其他以任何形式，利用本發明之人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白進行之治療作用，也都是在本發明的範疇之內。

實施例



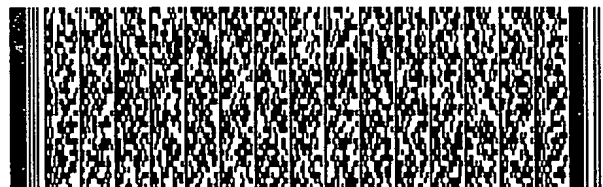
五、發明說明 (12)

本發明將藉由以下的實施例而作更進一步地詳細說明，但這些實施例僅是作為舉例說明，而非用以限定本發明之範疇。

實施例1：hCOLA1之cDNA選殖

使用Clontech SMART RACE cDNA增殖套組以選殖hCOLA1 cDNA。專一性的核酸引子是由已知的部份人類基因體選植株682J15 (Genbank編號AL034452) 所推導而得。首先，取1微克 (μg) 人類所有組織混合之總體RNA (Clontech)，使用Superscript II反轉錄酶配合專一性引子5'-GGTTCACCTTTGCTTCCCTTAG-3' (由選植株682J15所推得)，並根據使用手冊所建議的方法而合成第一股cDNA。將此cDNA再次進行5'-RACE反應，使用專一性引子5'-TTGGCCCATTAATCCTCGGTTTC-3' (對應於hCOLA1 cDNA的核苷酸1823-1845) 以及套組所提供的通用引子，得到長度約300鹼基對的增殖產物。所有的反應均在50微升 (μl) 的反應管中，使用GeneAmp PCR系統9600 (Perkin-Elmer Cetus) 而進行。

將所得到的PCR產物核酸序列送入Genbank資料庫中比對，獲得一長度約146 kb含有推測的起始密碼之選植株，並以此設計專一性引子，以用於選殖完整編碼區域的hCOLA1 cDNA。取1微克的人類所有組織混合之總體RNA (Clontech)，使用Superscript II反轉錄酶配合寡胸腺核苷 (oligo-dT) 引子，而合成第一股cDNA。反轉錄之



五、發明說明 (13)

後，取1微克的反應混合物，配合專一性上游引子5'-ATTCCTGGGCCACCTGGTCCGATA-3'（對應於選植株708F5（Genbank編號AL031782）最5'端起始甲硫胺酸的核苷酸序列），以及下游引子5'-CTAATAGTTTGGTCCTTTTCT-3'（對應於選植株682J15的3'端終止密碼）並根據使用手冊所建議的方法而進行PCR增殖反應。結果得到長度約2.9 kb之單一反應產物（如第1圖，第3道）。將此反應產物從瓊脂凝膠中切下，並以SmaI的限制酶切位選殖到Bluescript II KS(+)載體中（Strategene），得到一重組載體，其構築請參見第2圖，命名為Bluescript KS(+)/ *Escherichia coli* DH5 α (hCOLA1)，於中華民國食品工業發展研究所菌種中心之寄存編號是CCRC 940331。經由序列分析之後，發現此PCR產物含有一完整的hCOLA1開放譯讀架構。

實施例2：核苷酸定序

以Sanger雙脫氧核苷酸鏈鎖終止法（Sambrook, et al., 1989）而進行核苷酸定序。將樣品使用Ampli Taq循環定序套組（Perkin-Elmer）而製備，並根據使用手冊所建議的方法而進行。樣品以377自動定序儀而定序

（Perkin-Elmer），所有的序列均以有意義（sense）股及反義（antisense）股進行確認。hCOLA1 cDNA之核苷酸序列（序列辨識編號：5）及所推導的胺基酸序列（序列辨識編號：1；以單一字母代表）顯示在第3圖中。



實施例3：北方墨漬分析

將含有2微克poly(A)+ RNA之各種組織（包括，腦、心、骨骼肌、直腸、胸腺、脾、腎、小腸、肝、胎盤、肺及血管）的人類多組織北方墨漬樣品（購自Clontech，7780-1），以隨機的³²P-標記探針（509鹼基對；對應於所選殖的hCOLA1 cDNA片段之核苷酸1236-1845），在60℃以ExpressHyb溶液進行雜交反應1小時，並以2x SSC/0.1% SDS，在室溫下短暫清洗，然後再以0.2x SSC/0.1% SDS，在60℃清洗1小時。使用 β -肌動蛋白作為RNA量的對照組。北方墨漬分析的結果如第6圖所示，顯示本發明新穎之 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白的基因，主要是在心臟及胎盤中表現。

實施例4：hCOLA1基因在原核細胞之表現及純化

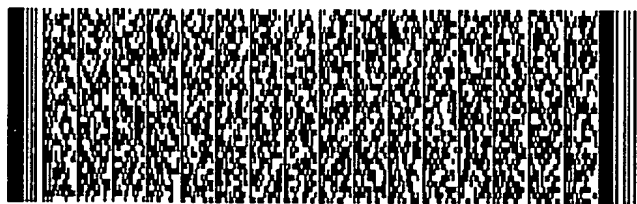
將hCOLA1 cDNA之完整的開放譯讀架構，以引子對5'-ATGGCTCACTATATTACATTTCTC-3'（對應於cDNA的5'區域），以及5'-TTAGTGATGGTGATGGTGATGCTCATAGTTTGGTCCTTTTCTG-3'（對應於cDNA的3'區域，包括終止密碼前的6個組織胺酸殘基），並根據使用手冊所建議的方法而進行PCR增殖反應。將增殖的DNA構築以凝膠純化，並且以NcoI的限制酶切位次選殖至表現載體pET 15b中（Novagen），然後以克勒諾（Klenow）片段將其補平。將此表現載體轉形至大腸



五、發明說明 (15)

桿菌BL21 (DE3) 中。將轉形的大腸桿菌培養在37℃，在含有100微克/毫升的氯苄青黴素的LB培養液中培養，當細菌生長至光學密度 (OD600 nm) 達0.7時，以最終濃度為1 mM的異丙基硫代半乳糖苷 (IPTG)，誘導表現，並使細菌持續生長2-3小時，以表現hCOLA1膠原蛋白；其溶胞物 (lysate) 經硫酸十二酯鈉-聚丙稀醯胺電泳 (SDS-PAGE) 分析，得到分子量約為98 kDa的蛋白質表現條帶，結果如第7(A)圖所示。

將培養液以5,000 xg離心30分鐘，細菌細胞以磷酸鹽緩衝溶液 (PBS) 清洗，並再次離心。然後將細胞沈澱物再懸浮於20毫升含有1 mM苯基甲基磺醯氟 (PMSF；蛋白酶抑制劑) 的PBS中。將細胞懸浮液進行超音波震盪以打破細胞壁。細菌溶胞物以30,000 xg離心40分鐘；將上清液置入鎳-瓊脂糖管柱 (5毫升)，流速0.5毫升/分鐘，並以50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) 平衡。管柱以含有40 mM咪唑的相同緩衝液沖提。重組的hCOLA1膠原蛋白係在含有250 mM咪唑的相同緩衝液流份中沖提出來。將此沖提液定量並經由SDS-PAGE分析，以考馬斯藍 (Coomassie blue) 染色後在分子量大小為98 kDa之位置有一蛋白染色帶 (如第7(B)圖，第一道)。同時，將未純化之蛋白轉印至一PVDF膜上，並以抗組織胺酸抗體 (anti-histidine tag antibody，購自Clontech) 偵測，如第7(B)圖所示，第2道為未誘導之細胞溶胞物；第3道為經IPTG誘導2小時但未純化之細胞溶胞物。第3道中，有一分子量為98 kDa位置



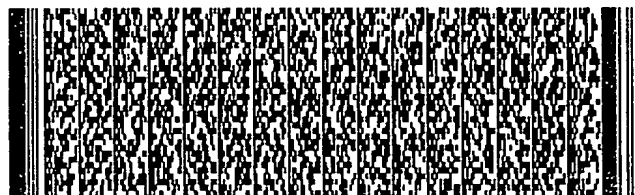
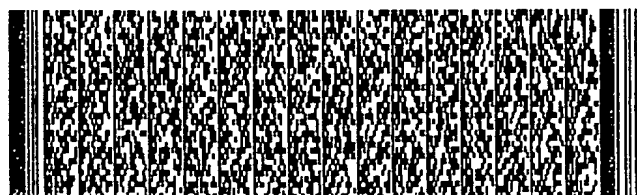
五、發明說明 (16)

之蛋白與抗組織胺酸抗體結合，且不存在於未誘導之細胞溶胞物中。該蛋白可證實即為本發明所表現的融合組織胺酸之hCOLA1膠原蛋白。

實施例5：hCOLA1基因在真核細胞之表現

將實施例4所增殖之含有完整開放譯讀架構的hCOLA1 cDNA產物以凝膠純化，並且以 *Pme* I 的限制酶切位次選殖至表現載體pcDNA3.1中（含有細胞巨大病毒啟動子（PCMV）；購自Invitrogen），然後以克勒諾（Klenow）片段將其補平。將此表現載體以Superfect（購自Qiagen）而轉染（transfect）至哺乳動物細胞COS7中，並在含有10%胎牛血清（fetal bovine serum；FBS）之DMEM培養液（Life Technologies）中培養。培養48小時後，取大約 10^6 個細胞，抽取整體RNA。取0.2微克之RNA，並以Oligo dT引子進行反轉錄（reverse transcription）反應。反轉錄後，取5微升之溶液，並以位於pcDNA3.1載體上之T7與BGHrev引子進行PCR。其RT-PCR結果如第8圖所示，顯示所轉染的表現載體可在哺乳動物細胞中表現。

請參考第4圖，本發明之人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白之胺基酸序列一級結構，經由Kyte-Doolittle疏水性分析所繪製的疏水性分布圖，顯示在胺基端具有一段長度為22個胺基酸的訊號胜肽(signal peptide)，因此推測本發明之人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白應位於細胞外的間質（extracellular



五、發明說明 (17)

matrix)。

使用DNASTAR®軟體，將本發明之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白之胺基酸序列與目前已知的19種膠原蛋白比對，特別是與其結構最接近的第IX及XIX型膠原蛋白，其胺基酸序列之相同性(identity)分別為24%及27%，結果如第9圖所示，顯示其為完全新穎之膠原蛋白。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

序列表

序列辨識編號：1 (SEQ ID NO: 1)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：954 胺基酸

(B) 形式：胺基酸

(ii) 分子形式：蛋白質

(iii) 特性：

(A) 名稱：人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白

(B) 其他資訊：/P=P*=羥基脯胺酸"



五、發明說明 (18)

MAHYITFLCMVLVLLLQNSVLAEDGEVRSSCRTAPTDLVFILDGSSVGP 50
ENFEIVKKWLNVNITKNFDIGPKFIQVGVVQYSDYPVLEIPLGSYDSGEHL 100
TAAVESILYLGGNKTGKAIQFALDYLFKSSRFLTKIAVVLTDGKSQDD 150
VKDAAQAARDSKITLFAIGVGSETEDAELRAIANKPSSTYVFFYVEDYIAI 200
SKIREVMKQKLCEESVCPTRIPVAARDERGFILLGLDVNKKVKKRIQLS 250
PKKIKGYEVTSKVDLSELTSNVFPEGLPPSYVVFVSTQRFKVKKIWDLWRI 300
LTIDGRPQIAVTLNGVDKILLFTTTSVINGSQVVTFANPQVKTLFDEGWH 350
QIRLLVTEQDVTLYIDDQQIENKPLHPVLGILINGQTQIGKYSKKEETVQ 400
FDVQKLRIYCDPEQNNRETACEIPGFCLNGPSDVGSTPAPCICPPGKPLG 450
QGPKGDPGLPGNPGYPGQPGQDGKPGYQGIAGTPGVPGSPGIQGARGLPG 500
YKGEPGRDGDGKDRGLPGFPGLHGMPGSKGEMGAKGDKGSPGFYGKKGAK 550
GEKGNAGFPGLPGPAGEPGRHGKDGLMGSPGFKGEAGSPGAPGQDGTRE 600
PGIPGFPPGNRGLMGQKGEIGPPGQQGKKGAPGMPGLMGNSGSPGQPGTPG 650
SKGSKGEPGIQGMPGASGLKGEPGATGSPGEPGYMGLPGIQGKKGDKGNQ 700
GEKGIQGGKGENGRQGI PGQQGIQGHGAKGERGEKGE PGVRGAIGSKGE 750
SGVDGLMGPAKPGKQPGDPGPQGPGLDGKPGREFSEQFIRQVCTDVIRA 800
QLPVLLQSGRIRNCDHCLSQHGSPIPGPPGP IGPEGPRGLPGLPGRDGV 850
PGLVGVPGRPGVRGLKGLPGRNGEKGSQGFYGPGEQGP PGPPGPEGPPGI 900
SKEGPPGDPGLPGKDGDHGKPGIQGQPGPGICDPSLCFSVIARRDPFRK 950
GPNY 954

序列辨識編號：2 (SEQ ID NO: 2)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：171 胺基酸

(B) 形式：胺基酸

(ii) 分子形式：胜肽

(iii) 特性：

(A) 名稱：偉勒布業德因子功能部位



五、發明說明 (19)

DLVFILDGSYSVGPENFEIVKKWLVNITKNFDIGPKFIQVGVVQYSDYPV 50
LEIPLGSYDSGEHLTAAVESILYLGGNTKTGKAIQFALDYLFKSSRFLT 100
KIAVVLTGKSQDDVKDAAQAARDSKITLFAIGVGSETEDAELRAIANKP 150
SSTVVFYVEDYIAISKIREVM 171

序列辨識編號：3 (SEQ ID NO: 3)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：183 胺基酸

(B) 形式：胺基酸

(ii) 分子形式：胜肽

(iii) 特性：

(A) 名稱：類-凝血因子胺基端功能部位

GFDILLGLDVNKKVKKRIQLSPKKIKGYEVTSKVDLSELTSNVFPEGLPP 50
SYVVFVSTQRFKVKKIWDLWRILTIDGRPQIAVTLNGVDKILLFTTTSVIN 100
GSQVVTFANPQVKTLFDEGWHQIRLLVTEQDVTLYIDDQQIENKPLHPVL 150
GILINGQTQIGKYSGKEETVQFDVQKLRIYCDP 183

序列辨識編號：4 (SEQ ID NO: 4)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：509 胺基酸

(B) 形式：胺基酸

(ii) 分子形式：胜肽

(iii) 特性：



五、發明說明 (20)

(C) 名稱：膠原蛋白功能部位

(D) 其他資訊：/P=P*= 羧基脯胺酸"

```
GKPG LQGPKGDPGLPGNPGYPGQPGQDGKPCYQGIAGTPGVPGSPGIQGA 50
RGLPGYKGEPRDGDGDRGLPGFPG LHMPSKGE MGA KGDKGSPGFY G 100
KKGAKGEKGNAGFPGLPGPAGEPRHGKDGLMGSPGFKGEAGSPGAPGQD 150
GTRGEPGIPGFPGNRGLMGQKGEIGPPGQQGKKGAPGMPGLMGSNGSPGQ 200
PGTPGSKGSKGEPGIQGMPGASGLKGEPGATGSPGEPGYMGLPGIQGKKG 250
DKGNQGEKGIQGGQKGENGRQGIPGQQGIQGHGAKGERGEKGEPEGVRGAI 300
GSKGESGVDGLMGPAGPKQPGDPPGQPPGLDGKPGREFSEQFIRQVCT 350
DVIRAQLPVLLQSGRIRNCDHCLSQHGSPGIPGPPGPIGPEGPRGLPGLP 400
GRDGVPLVGVPRPGVRGLKGLPGRNGEKSGQFGYPGEQGPPEGPPGPE 450
GPPGISKEGPPGDPGLPGKGDGDKGPGIQQQPGPPGICDPSLCFSVIARR 500
DPFRKGPNY 509
```

序列辨識編號：5 (SEQ ID NO: 5)

(i) 序列特徵：

(A) 長度：2,865 鹼基對

(B) 形式：核酸

(iv) 分子形式：cDNA

(v) 特性：人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白

```
atggctcactatattacatttctctgc atggttttgggtgctgcttcttcagaattctgtg 60
cttagctgaagatggggaagtaagatcaagttgtcg tactgctccgacagatttagttttc 120
atcttagatggctctttatagtggtggcccgagaaaactttg saaatagtga aaaagtggtt 180
gtcaatatcacaaaaaactttgacatagggccggaagttattcaagttggagtggttcaa 240
tatagtgactaccctgtgctggagattcctctcgggaagctatgattcaggagaacatttg 300
```



五、發明說明 (21)

acggcagcagtggaatccatctctacttaggaggaacacaaagacagggaaggccatc	360
cagtttgcgctcgattaccttttgccaaagccacgatctctgactaagatagcagtg	420
gtacttacggatggcaaatcccaagatgacgtcgaagatgcagctcaagcagcaagagat	480
agt aagat aacattat ttgctat tgggtgt tgggttcagaacagaagatgcggaacttaga	540
gctattgcacaacagccttcgtctacttatgtgttttatgtggaagactatatcgcaata	600
tcccaaat aagggaagtgat gaagcagaaactttgtgaagaatctgtctgtccaacacga	660
attccagtggcagctcgtgatgaaggggat ttgatattcttttaggttagatgtaaat	720
aaaaaggttaagaaaagaatcacgctttcaccaaaaaagataaaaggatatgaagtaaca	780
tcaaaagtgtat ttatcagaactcacaagcaatgtttcccagaaggcttcctccatca	840
tatgtatttgtgtctactcaaagatttaagtcagaaaaatttgggat ttatggagaata	900
ctaactatgtatggaaggccacaaatagcagttaccttaaatgggtgtggacaaaatctta	960
tattttacacaaccagcgtaat taatggctcacaaagtgggtacctttgctaaccctcaa	1020
gttaagacgttgtttgatgaaggctggcaccaaatctgtctcttagtaacagaacaagat	1080
gtgactttgtatattgatgaccaacaaat tgaasacaagcccttacctccagtttaggg	1140
atcttgatcaatgggcaaacccaaattggaaaatattctggaaaagaagaactgttcag	1200
tttgatgtccaaaagt tgcgaatctactgtgacccagaacagaacaaccgggagacagca	1260
tgtgagatccctggat ttgacctaatgggtccagtgatgtaggttcaactccagctccc	1320
tgtatttgtcctccgggaaaaccaggacttcaggccccaagggtgacctggactgcct	1380
gggaaccc tggctaccctggacaacctggtcagatggttaagcc tggatatcagggaatt	1440
gcagggacaccaggtgttccaggatctccaggaatcacaggagctcgaggactaccaggt	1500
tacaaaggagaaccagggtcgagatggtgacaagggtgatcgtggacttcc tgggtttcct	1560
gggcttcatggcatgcaggatc aaagggtgaaatgggtgccaaaggagacaaaggatca	1620
cctggattttatggcaaaaagggtgcaaaagggtgaaaagggtgaaatgctggcttcctggc	1680
ctccctggacctgttggaagaaccaggagacatggaaaggatggat taatgggtagtccc	1740
gggttcaagggaagaagcaggatccctgggtgctccggggcaggatgggaacacggggagag	1800
cctggaatccaggat ttctggaaaccgaggattaatgggccaaggggagaaattggg	1860
cctccaggacagcaagggaaaaaaggagcccaaggga tgcctgggtt taatgggaagcaat	1920
ggctcaccaggccagcctgggaacacggggtctaaagggaagc aaagggtgaacctggaatt	1980



五、發明說明 (22)

caagggatgcctggggcttc tgggctc aagggagaaacaggagc aacgggttcc ccagga	2040
gaaccaggat ac atgggt tt acccgggat tc aaggaaaaaagggggacaaaggaaat caa	2100
ggt gaaaaagggt at tc aggggtcaaaaggga gaaatggaa gacagggaat tc cagggtcaa	2160
cagggaat tc aaggccat catgggt gcaaaaggga gaga gagggt gaaaaagggaacctgggt	2220
gtc cgagggtgcc at tggatc aaaaaggagaat ct gggtggat ggct t gat gggggcccgc a	2280
gggt cct aaggggcaac ct ggggat cc aggtc ct cagggac ccc cagggt tt ggat gggaa g	2340
cccggaagagagtt tt cagaacaat tt at tc gacaagttt gc ac agat gt aa taagagcc	2400
cagctaccagtc tt actt cagagtggaagaatt agaaatt gt gatcat tgcc tgtcc caa	2460
cat ggt tcccgggtatt cc tgggcccacc tgggt cc gataggccc agagggtccc agagga	2520
t tacctgggtt tggcaggaa gaga tgggt gt tc ct ggat tagtgggtgtccc tggacgtcca	2580
gggt gtc agaggatt aaaaaggcct ac cagggaaga aatggggaaaaaggga gccaagggttt	2640
gggtat cc tggagaac aagggtcc tc ct gggtcccc aggtc cagagggtccc tc ct ggaata	2700
agcaagaagggt cctc caggagacc aggtc tc ct tggcaaatatggagacc atggaaaa	2760
cct ggaat cc aagggtc aaccagggtcccc aggtat ct gcgaccc at cact at gt ttt agt	2820
gtaattgc cagaagagat ccgtt cagaaaaggacc aaact at tag	2865



六、申請專利範圍

1. 一種編碼人類 $\alpha 1$ 鍵膠原蛋白之分離的核酸分子及其簡併序列，其包括如序列辨識編號：5 之核苷酸序列：

atggctcactatattacatttctctgcatggttttgggtgctgcttcttcagaattctgtg	60
ttagctgaagatggggaagt aagatcaagttgtcgtactgctccgacagatttagttttc	120
atcttagatggctctttatagtgttggccagaaaaactttgaaatagtga aaagtggctt	180
gtcaatatcaceaaaaactttgacatagggtcgaagt ttattcaagttggagtggttcaa	240
tatagt gactacccgttgctggagattcctctcggaa gctatgattcaggagaacatttg	300
acggcagcagtggaatccatactctacttaggaggaacacaaagacagggaaggccatc	360
cagtttgcgtcgtattaccttttgccaagtctc acgat ttctgactaagatagcagtg	420
gtacttacggatggcaaatcccaagatgacgtcaaggatgcagctcaagcagcaagagat	480
egt aagataacattatttgctattgggtgttggttcagaaacagaagatgccgaacttaga	540
gctattgc caacagccttcgtctacttatgtgttttatgtggaagactatattgcaata	600
tccaaat aagggaagtgatgaagcagaaactttgtgaagaatctgtctgtccaacacga	660
attccagtggcagctcgtgatgaagggggat ttgatattcttttaggttagatgtaaat	720
aaaaggttaagaaaagastacagctttacc caaaaaagataaaaggatatgaagtaaca	780
tcaaaagt tgatttatcagaactcacaagcaatgtttcccagaagggtcttctccatca	840
tatgtatttggtgtctactcaaagatttaagtc aagaaaatttgggat ttatggagaata	900
ttaactattgatggaaaggccacaaatagcagttaccttaaatgggtgtggacaaaatctta	960
tattttacaacaaccagcgtaat taatggctcacaagtggttacctttgttaaccctcaa	1020
gttaagacgttgtttgatgaagggtggcacc aaatctgtctcttagtaacagaacaagat	1080
gtgactttgtatattgatgaccaacaaat tgaaaacaagtccttacatccagtttaggg	1140
atcttgatcaatgggtc aaacccaaatttgaaatatcttgga aaagaagaactgttcag	1200
tttgatgtccaaaagt tgcgaaatctactgtgacccagaacagaacaacggggagacagca	1260
tgtgagat tcttggat tttgctttaatgggtccagtgatgtagggttcaactccagctccc	1320
tgtatttgctctccgggaaaaccaggact tcaagggtcccaagggtgaccttggactgcct	1380
gggaaccttggctaccctggacaacctgggtc aagatggtaagcctggatatcagggaatt	1440
gcagggacaccaggtgttccaggatctcc aggaatacaaggagctcgaaggctaccaggt	1500
tacaaaggagaaccagggtcgagatgggt gacaagggtgatcgtggacttcttgggttttctt	1560
gggcttcatggcatgccaggatc aaagggtgaaatgggtgccaaaggagacaaaggatca	1620



六、申請專利範圍

cctggattttatggcaaaaggggtgcaaaagggtgaaaaggggaatgctggcttccttggc	1680
ctccctggacctgctggagaaccagggaagacatggaaaggatggattaatgggtagtccc	1740
ggtttcaggggagagcaggatcccctggtgctccggggcaggatggaacacggggagag	1800
cctggaatccaggatttcttggaaaccgaggattaatgggccaagggagaaattggg	1860
cctccaggacagcaaggaaaaaaaggagc ccagggatgacctggtttaatgggaagcaat	1920
gggtcaccaggccagcctggaacacggggtatctaaagggaagc aaagggtgaacctggaatt	1980
caaggggatgacctggggcttctgggctc aaagggaagacaggagcaacgggttcccaggga	2040
gaaccaggat acatgggtttaccggggtatctaaaggaaaaagggggacaaaggaaatcaa	2100
ggtgaaaaagggtatctagggtcaaaaggagagaaatgggaagacagggaattccaggggcaa	2160
cagggaattcaagggtccatcatggtgcaaaaggagagagaggtgaaaaggagaaacctggt	2220
gtccgagggtgccat tggatcaaaaggagaatctggggtggatggcttgatggggcccgca	2280
ggtcctaaaggggcaacctggggaaccagggtcctcagggtaccccagggttggtatgggaag	2340
cccgggaagagagttttcagaacaatttatctgacaagtttgcacagatgtaataagagcc	2400
cagctaccagtcctacttcagagtggaaagaaattagaaattgtgatcatgcttgctccaa	2460
catggtctcccgggtattcctgggcccacctgggtccgataggccagagggtcccagagga	2520
ttacctggtttgccagggaagagatgggtgttcctggat tagtgggtgtccctggacgtcca	2580
ggtgtcagaggattaaaaggcctaccagggaagaaatggggaaaaaggagccaaagggttt	2640
gggtatccctggagaacaaaggctcctcctggtccccagggtccagagggtccctcctggaata	2700
agcaaaagaagggtcctccaggagaccagggtctcctggcagaagatggagaccatggaaa	2760
cctggaatccaagggtcaaccagggtccccagggtatctgcgacctatcactatgttttagt	2820
gtaattgcccagaagagatccgttcagaaaaggaccaaactat tag 2865	

2. 如申請專利範圍第1項所述之核酸分子，其編碼具有序列辨識編號：1之胺基酸序列的人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白。

3. 如申請專利範圍第2項所述之核酸分子，其中該人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白包括：

(i) 如序列辨識編號：2所示之偉勒布業德因子功能部位；

(ii) 如序列辨識編號：3所示之類-凝血因子胺基端



六、申請專利範圍

功能部位；以及

(iii) 如序列辨識編號：4所示之膠原蛋白功能部位。

4. 如申請專利範圍第1項所述之核酸分子，其包括去氧核糖核酸（DNA）以及核糖核酸（RNA）。

5. 如申請專利範圍第4項所述之核酸分子，其中該去氧核糖核酸包括互補DNA（cDNA）以及基因體DNA。

6. 一種人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，具有序列辨識編號：1所示之胺基酸序列：

```
MAHYITFLCHVLVLLQLNSVLAEDGEVRSSCRTAPTDLVFI LDGSYSVGP 50
ENFEIVKKULVNITKNFDIGPKFIQVGVVQYSDYPVLEIPLGSYDSGEHL 100
TAAVESILYLGGNTKTGKAIQFALDYLFAKSSRFLTKIAVVLT DGKSQDD 150
VKDAAQAARDSKITLFAIGVGSETEDAELRAIANKPSSTYVFYVEDYIAI 200
SKIREVMKQKLCEESVCPTRIPVAARDERGF DILLGLDVNKKVKKRIQLS 250
PKKIKGYEVT SKVDLSELTSNVFPEGLPPSYV FVSTQRFKVKKI WDLWRI 300
LTIDGRPQIAVTLNGVDKILLFTTTTSVINGSQV VTFANPQVKTLFDEGWH 350
QIRLLVTEQDVTLYID DQQIENKPLHPVLGIL INGQTQIGKYS GKEETVQ 400
FDVQKLRIYCDPEQNNRETACEIPGFCLNGPSDVGSTPAPCICPPGKPGL 450
QGPKGDPGLPGNPGYPGQPGQDGKPGYQGIAGTPGVPGSPGIQGARGLP 500
YKGEPGRDGDKGDRGLPGFPGHLHGMPGSKGEMGAKGDKGSPGFYGKKGAK 550
GEKGNAGFPGLPGPAGEPGRHGKDGLMGSPGFKGEAGSPGAPGQDGT RGE 600
PGIPGFPGNRGLMGQKGEIGPPGQQGKKGAPGM PGLMGSNGSPGQPGTPG 650
SKGSKGEPGIQGMPGASGLKGEPGATGSPGEPGYMGLPGIQGKKGD KGNQ 700
GEKGIQGQKGENGRQGIPGQQGIQGHGAKGERGEKGE PGVRGAIGSKGE 750
SGVDGLMGPA GPKGQPGDPGPQGPGLDGKPGREFSEQFIRQVCTDVIRA 800
```



六、申請專利範圍

QLPVLLOSGRIRNCDHCLSQHGSPGIPGPPGPIGPEGPRGLPGLPGRDGV 850
PGLVGVPGRPGVRGLKGLPGRNGEKGSQGFGYPGEQGPPGPPGPEGPPGI 900
SKEGPPGDPGLPGKGDHKGPGIQGQPGPPGICDPSLCFSVIARRDPFRK 950
GPNY 954

7. 如申請專利範圍第6項所述之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，係由申請專利範圍第1項之核酸分子所編碼。

8. 如申請專利範圍第7項所述之人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白，包括：

(i) 如序列辨識編號：2所示之偉勒布業德因子功能部位：

DLVFILDGYSVGPENFEIVKKULVNITKNFDIGPKFIQVGVVQYSDYPV 50
LEIPLGSYDSGEHLTAAVESILYLGGNTKTGKAIQFALDYLFKSSRFLT 100
KIAVVLTDGKSQDDVKDAAQAARDKITLFAIGVGSETEDAELRAIANKP 150
SSTVVFYVEDYIAISKIREVM 171 ；

(ii) 如序列辨識編號：3所示之類-凝血因子胺基端功能部位：

GFDILLGLDVNKKVKKRIQLSPKKIKGYEVTSKVDLSELTSNVFPEGLPP 50
SYVVFVSTQRFKVKKIWDLWRILTIDGRPQIAVTLNGVDKILLFTTTSVIN 100
GSQVVTFANPQVKTLFDEGWHQIRLLVTEQDVTLYIDDQQIENKPLHPVL 150
GILINGQTQIGKYSKGKEETVQFDVQKLRIYCDP 183

；以及

(iii) 如序列辨識編號：4所示之膠原蛋白功能部位：



六、申請專利範圍

GKPG LQGP KGD PGL PGN PGYP GQPG QDGK PGYQGI AGTPGVPGSPGIQGA 50
RGLPGYKGEPGRDGDKGDRGLPGFPGLHGMPSKGENGAKGDKGSPGFYG 100
KKGAKGEKGNAGFPGLPGPAGEPGRHGKDG LMGSPGFKGEAGSPGAPGQD 150
GTRGEPGIPGFPGNRGLMGQKGEIGPPGQQGKKGAPGMPGLNGSNGSPGQ 200
PGTPGSKSGSKGEPG IQGM PGASGLKGEPGATGSPGEPGYMGLPGIQGKKG 250
DKGNQGEKGIQGGKGENGRQGIPGQQGIQGHGAKGERGEKGE PGVRGAI 300
GSKGESGVDGLMGPAGPKGQPGDPGPQGPPGLDGKPGREFSEQFIRQVCT 350
DVIRAQLPVLLQSGRIRNCDHCLSQHGSPGIPGPPGPIGPEGPRGLPGLP 400
GRDGVPLVGVPGRPVGRGLKGLPGRNGEKGSQGF GYPGEQGPPGPPGPE 450
GPPGISKEGPPGDPGLPGKGDH GKPGIQGQPGPPGICDPSLCFSVIARR 500
DPFRKGPNY 509

9. 一種重組載體，其包括如申請專利範圍第1項所述之核酸分子以及一調控序列。

10. 如申請專利範圍第9項所述之重組載體，其中該調控序列包括可操作連接的啟動子。

11. 如申請專利範圍第9項所述之重組載體，命名為 Bluescript KS(+)/ *Escherichia coli* DH5 α (hCOLA1)，其於中華民國食品工業發展研究所菌種中心之寄存編號是 CCRC 940331。

12. 一種表現人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白的方法，包括：

(a) 將申請專利範圍第9項之重組載體轉形或轉染至一宿主細胞中；

(b) 在一適當條件下培養該轉形或轉染的宿主細胞，以使其表現人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白；以及

(c) 純化及回收該人類 $\alpha 1$ 鏈膠原蛋白。



六、申請專利範圍

13. 如申請專利範圍第12項所述之方法，其中該宿主細胞包括原核細胞或真核細胞。

14. 如申請專利範圍第13項所述之方法，其中該原核細胞包括大腸桿菌。

15. 如申請專利範圍第13項所述之方法，其中該真核細胞包括哺乳動物細胞。

16. 如申請專利範圍第12項所述之方法，其中純化及回收的步驟係利用管柱層析進行。

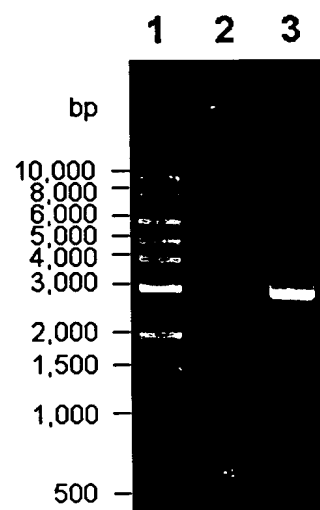
17. 一種分離之核酸分子，其包括序列辨識編號：5之至少500個核苷酸片段或其簡併序列。

18. 一種檢驗試劑，其可用於在人類或哺乳動物中，偵測其體內序列辨識編號：5之核酸序列突變有關的疾病，此檢驗試劑包括一作為偵測用之核酸探針，其包括申請專利範圍第1項或第17項之核酸分子。

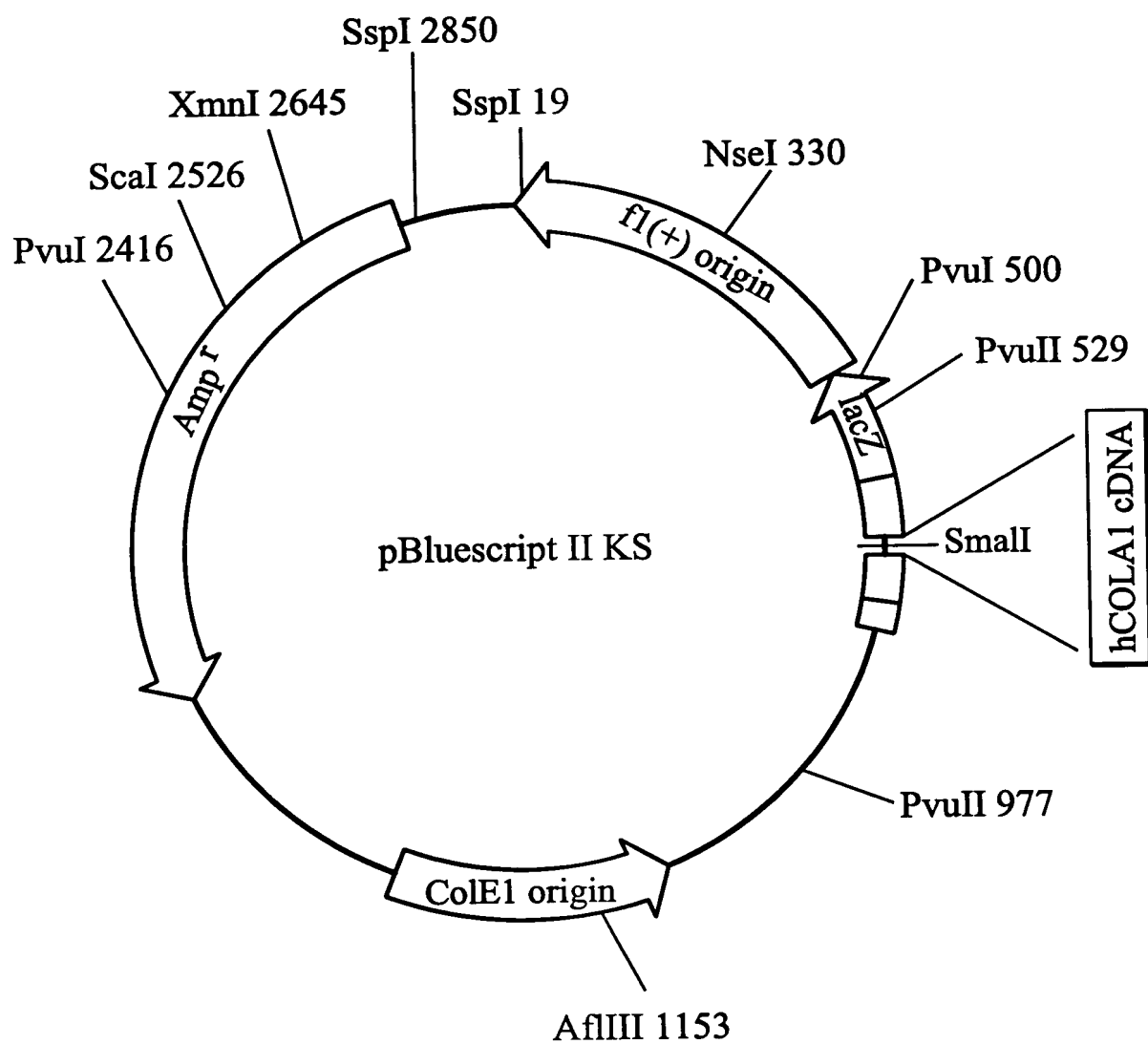
19. 一種分離之核酸分子，其包括序列辨識編號：5之至少20個連續核苷酸序列或其簡併序列。

20. 一種檢驗試劑，其可用於在人類或哺乳動物中，偵測其體內序列辨識編號：5之核酸序列突變有關的疾病，此檢驗試劑包括一對核酸引子，其包括申請專利範圍第19項之核酸分子。

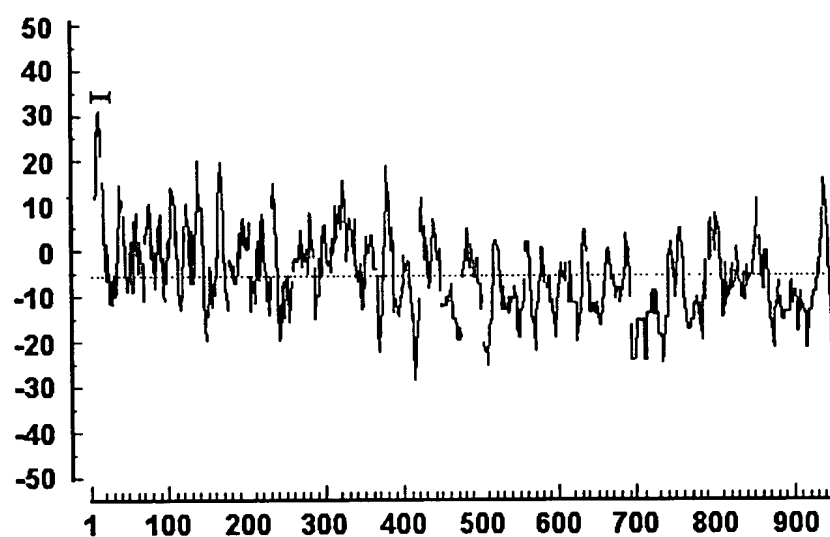




第 1 圖



第 2 圖



第 4 圖

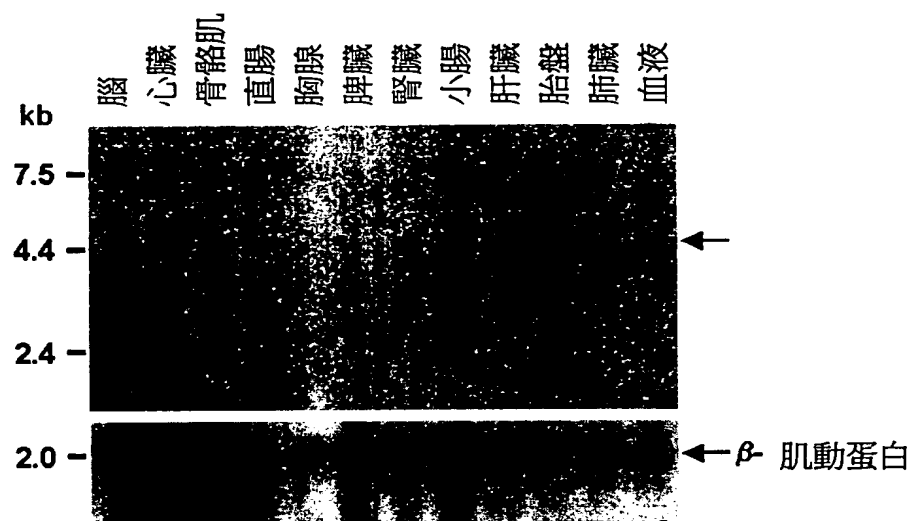


偉勒布業德因子 A 功能部位

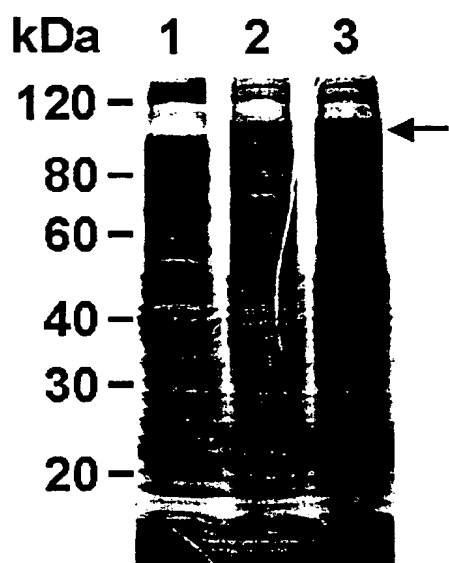
類-凝血因子胺基端功能部位

膠原蛋白功能部位

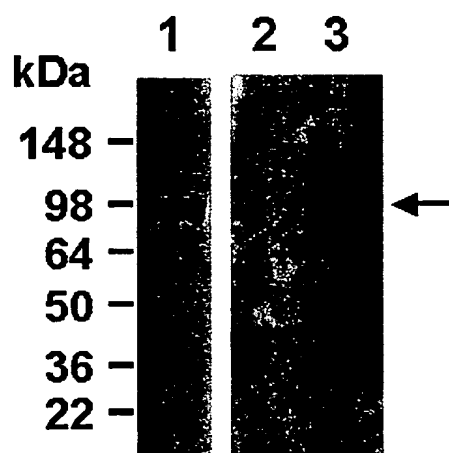
第 5 圖



第 6 圖

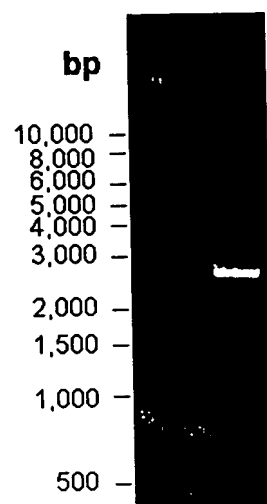


第 7a 圖



第 7b 圖

hCOLA1 - +



第 8 圖

hCOLA1 .PRO MA - - - - - HYITFLCMVLLVLL LQNSVLA E 23
Col9a1.pro MK - - - - - TCWKIPVFF FVCSFLEPWASAAVKRR 28
Col19a1.pro MRLTGPWPL - - - - - WLWMSIFILP-ASTSVTVR 27

hCOLA1 .PRO DGEVRS SCRTAPTDLVFIL DGSYSVGPENF 53
Col9a1.pro PRFPVNSNSNGGNELCPKIRIG-QDDLPGE 57
Col19a1.pro DK - - - - - TEESCPIILRIE-GHQILT-Y 46

hCOLA1 .PRO EIVKKWL VNI TKNFDI GPKFI QVG VVQYS D 83
Col9a1.pro DLISQFQVD - - - - - KAASRRRAIQRVVGSAT 82
Col19a1.pro DNI NKL EVS - - - - - GFDLGD SFS LRRAFCESD 73

hCOLA1 .PRO YPVL EIP LGS YDSGEHLTA AVES I - LYL GG 112
Col9a1.pro LQV - - - - - AYKLGNNVDFRIPTRNLY - - - 103
Col19a1.pro -KT - - - - - CFKLGSALLIR-DTIKIF - - - 92

hCOLA1 .PRO NTKTGKAIQFALDYLFAKSSRF LTKIAVVL 142
Col9a1.pro - - - - - PSGLPPEEYSFLTTFRMTGSTLKKNWNIW 131
Col19a1.pro - - - - - PKGLPPEEYSVAAMFRVRRNAKKERWFLW 120

hCOLA1 .PRO TDGKSQDDVKDAAQAARD S KI TLF FAIGVGS 172
Col9a1.pro QIQDS SSGKEQVG I KIN GQTQS VVFSY - - - 157
Col19a1.pro QV L NQQNIPIGISIVVDGGK KVVEFMF - - - 146

hCOLA1 .PRO ETEDAELRAIANKPSSTYVFYVEDYIAISK 202
Col9a1.pro KGLDGS LQTA AFSN - - - - - LSS LFD S QWHKIM I 185
Col19a1.pro QATEGDV LNYIFERNRELRPLFDRQWHKLG I 176

hCOLA1 .PRO IREVMKQKLCEESVCPTRI PVAARDE - - - R 229
Col9a1.pro GVERSSATL FVDCNRIESLPIKPRGPIDID 215
Col19a1.pro SIQSQVISLYMDCNLIARRQTDEKDTVD F H 206

hCOLA1 .PRO GFDILLGLDV NKKVKKR IQLS PKKI KGYEV 259
Col9a1.pro GFAVLGK LADNPQVSVPFELQWMLIHCDPL 245
Col19a1.pro GRTVIATR ASDGK - PVDIELHQLKIYCSAN 235

hCOLA1 .PRO TS KVDLS - ELTSNVFPE - - - - - GLPPSYVF 283
Col9a1.pro RPRRETCHELPA RITPSQ - - - - - - - - 263
Col19a1.pro LIAQETCC EISDTKCPEQDGF GNIASSWVT 265

hCOLA1 .PRO VSTQRFK - - VKKIWDLW - - - - - RILTI DGRPQ 308
Col9a1.pro - - - - - - - - - - - - - - - - - - 263
Col19a1.pro AHASKMSSYLPAKLE LK DQCQCI PNKG EAG 295

hCOLA1 .PRO IAVTLNGVDKILLFTTTSVING S QVVT FAN 338
Col9a1.pro - - - - - TTDERGPPGEQGPPGASGPPGVPGIDG 290
Col19a1.pro LPGA PGSPGQKG HKGEPGENGLH GAPGFP 325

hCOLA1 .PRO PQVKTLFDEGW HQIRLLVTEQDVTLYIDQ 368
Col9a1.pro IDG - - - - - ERGPKGPPGPAGEP GKPGAP 316
Col19a1.pro QKG - - - - - EQGFEGSKGETGEKGEQGEKGD P 351

hCOLA1 .PRO QIBNKFLHPVLGILINGQTQIGKYS GKEET 398
Col9a1.pro GKPGT PGADGLTGPDGS PG S IGS KKGKKEP 346
Col19a1.pro ALA GLNGENG IKGVLGPHGPPGPKEGEGDT 381

hCOLA1 .PRO VQFDVQKI - - - RIYCDPEQNNRETA CEIPGF 426
Col9a1.pro GVP GS RGF PGR - GI PGP PGPPGTAGLP GEL 375
Col19a1.pro GP PGPPA LPGS LGI QGPQGPPGKEGQRGR 411

hCOLA1 .PRO CLNGPS DVGSTPAPCICPPGKPG - - - - - 449
Col9a1.pro GRVGPVGD PGR RGP - PGPPGPPGPGRGTIGF 404
Col19a1.pro GKTGP PGKPGPPGP - PGPPGI QGIHQTLGG 440

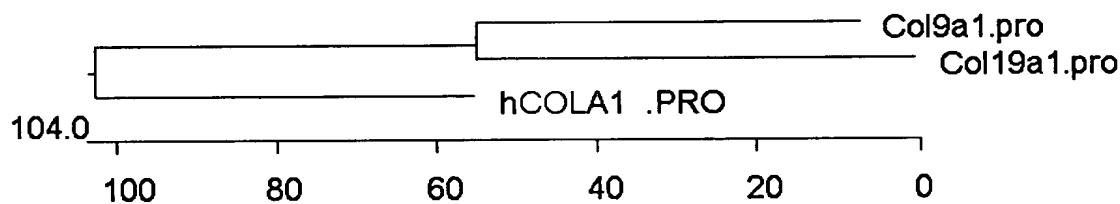
hCOLA1 .PRO - - - - - - - - - - - I QGPKGDPGLPGNP 463
Col9a1.pro HE - - - - - GDPLCPNACPPGRSGYPGLPGMR 429
Col19a1.pro DDNKDNKGNDEHEAGGIKGD KGETGLPGFP 470

第 9a 圖

hCOLA1 .PRO	G Y P G Q P G Q D G K P G - - - - -	476
Col9a1.pro	G H K G A K G E I G E P G R Q G H K G E E G D Q G E L G E V	459
Col19a1.pro	G S V G P K G G K G E P G E P F T H G E K G D R G E P G V I	500
hCOLA1 .PRO	- Y Q G I A G T P G V P G S P G I Q G A R G L P G Y K G E P	505
Col9a1.pro	G A Q G P - - - - - P G A Q G L R G I T G L V G D K G E K	483
Col19a1.pro	G S Q G V K G E P G D P G P P G I I G S P G L K G Q Q G S A	530
hCOLA1 .PRO	G R D G D K G D R G L P G F P G L H G M P G S K G E M G A K	535
Col9a1.pro	G A R G L D G E P G P Q G L P G A - - - P G D Q G Q R G -	508
Col19a1.pro	G S M G P R G P P G D V G L P G E H G I P G K Q G I K G E K	560
hCOLA1 .PRO	G D K G S - - - - P G F Y G K K G A K G E K G N A - - - -	556
Col9a1.pro	- - - - - P P G E A G P K G D R G A - - - - -	521
Col19a1.pro	G D P G G I I G P P G L P G P K G E A G P P G K S L P G E P	590
hCOLA1 .PRO	- - - - - G F P G L P G P A G E - - - P G R H G K D G L M	577
Col9a1.pro	- - E G A R G I P G L P G P K G D T G L P G V D G R D G - -	547
Col19a1.pro	G L D G N P G A P G P R G P K G E R G L P G V H G S P G D I	620
hCOLA1 .PRO	G S P G F - - - - - K G E A G S P G A P G Q D G T R G	599
Col9a1.pro	- - - - - I P G M P G T K G E P G K P G P P G D A G L Q G	571
Col19a1.pro	G P Q G I G I P G R T G A Q G P A G E P G I Q G P R G L P G	650
hCOLA1 .PRO	E P G I P G F P G N R G L M G Q K G E I G P P G Q Q G K K G	629
Col9a1.pro	L P G V P G I P G A K G V A G E K G S T G A P G K P G Q - -	599
Col19a1.pro	L P G T P G T P G N D G V P G R D G K P G L P G P P G D P I	680
hCOLA1 .PRO	A - - - - - - - - - - - P G M P G L M G S N	640
Col9a1.pro	- - - - - - - - - - - M G N S	603
Col19a1.pro	A L P L L G D I G A L L K N F C G N C Q A S V P G L K S N K	710
hCOLA1 .PRO	G S P G Q P G T P G - - - - - - - - - - - E V G P R G P Q G L P	650
Col9a1.pro	G K P G Q Q G P P G - - - - - - - - - - - G P R G P P G I P	624
Col19a1.pro	G E E G G A G E P G K Y D S M A R K G D I G P R G P P G I P	740
hCOLA1 .PRO	- - - - S K G S K G E P G I Q G M P G A S G L K G E P G A T	676
Col9a1.pro	G S R G E L G P V G S P G L P G K L G S L G S P G L P G L P	654
Col19a1.pro	G R E G P K G S K G E R G Y P G I P G E K G D E G L Q G I P	770
hCOLA1 .PRO	G S P G E P G Y M G L P G I Q G K K G D K G N Q G E K G I Q	706
Col9a1.pro	G P P G L P G M K G D R G V V G - - - E P G P K G E Q G A S	681
Col19a1.pro	G I P G A P G P T G P P G L M G R T G H P G P T G A K G E K	800
hCOLA1 .PRO	G Q K G E N G R Q G I P G Q Q G I Q - - - - - - - - -	724
Col9a1.pro	G E E G E A G E R G E L G D I G L P - - - - - - - - -	699
Col19a1.pro	G S D G P P G K P G P P G P P G I P F N E R N G M S S L Y K	830
hCOLA1 .PRO	- - - - - - - - - - - G H H G A K G E R G E K G E P G	740
Col9a1.pro	- - - - - - - - - - - G P K G S A G N P G E P G	712
Col19a1.pro	I K G G V N V P S Y P G P P G P P G P K G D P G P V G E P G	860
hCOLA1 .PRO	V R G A I G S K G E S G V D G L M G P A G P K G Q P G D P G	770
Col9a1.pro	L R G P E G S R G L P G V E G P R G P P G P R G V Q G E Q G	742
Col19a1.pro	A M G L P G L E G F P G V K G D P G P A G P P G I A G M S G	890
hCOLA1 .PRO	P Q G P P G L D G K P G R E F S E G F I R Q V C T D V I R A	800
Col9a1.pro	A T G L P G V Q G P P G R A P T D G H I K Q V C M R V I Q E	772
Col19a1.pro	K P G A P G P P G V P G E P G E R G P V G D I G F P G P E G	920
hCOLA1 .PRO	Q L P V L L Q S G R - - I R N C D H C L S Q H G S P G I P G	828
Col9a1.pro	H F A E M A A S L K R P D S G A T G L P G R P G P P G P P G	802
Col19a1.pro	P S G K P G I N G K D G I P G A E G I M G K P G D R G P K G	950
hCOLA1 .PRO	E - - - - - P G P I G P E G P R G L P G L P G R D G V P G	852
Col9a1.pro	P P G E N G F P G Q M G I R G - - - - - L P G I K G P P G	826
Col19a1.pro	E R G D Q G I P G D R G S Q G E R G K P G I T G M K G A I G	980

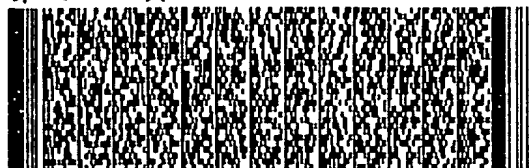
第 9b 圖

hCOLA1 .PRO	L V G V P G R P G V R G L K G L P G R N G E K G S Q G F - -	880
Col9a1.pro	A L G L R G P K G D L G E K G E R G P P G R - - - - -	848
Col19a1.pro	P M G P P G N K G S M G S P G H Q G P P G S P G I P G I P A	1010
hCOLA1 .PRO	- - - - -	880
Col9a1.pro	- - - - -	848
Col19a1.pro	D A V S F E E I K K Y I N Q E V L R I F E E R M A V F L S Q	1040
hCOLA1 .PRO	- - - - - G Y P G E Q G P P G P P G P	894
Col9a1.pro	- - - - - G P N G L P G A I G L P G - - - D	862
Col19a1.pro	L K L P A A M L A A Q A Y G R P G P P G K D G L P G P P G D	1070
hCOLA1 .PRO	E G P P G I S K E G P - - - - - P G D P G L P G	913
Col9a1.pro	P G P A S Y G K N G R D G E R G P P G - - - - -	881
Col19a1.pro	P G P Q G Y - - R G Q K G E R G E P G I G L P G S P G L P G	1098
hCOLA1 .PRO	K D - - - - G D H G K P G I Q G Q P G P P G I C D P S L C	938
Col9a1.pro	- - - - - L A G I P G V P G P P G P P G L P G F C E P A S C	906
Col19a1.pro	T S A L G L P G S P G A P G P Q G P P G P S G R C N P E D C	1128
hCOLA1 .PRO	F S V I A R R D P F R K G P N Y	954
Col9a1.pro	T M Q L V S - E H L T K G L T L E R L T A A W L S A	931
Col19a1.pro	L Y P V S H - A H Q R T G - - - - - G N	1142



第 9c 圖

第 1/31 頁



第 2/31 頁



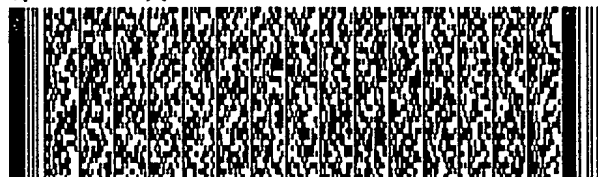
第 3/31 頁



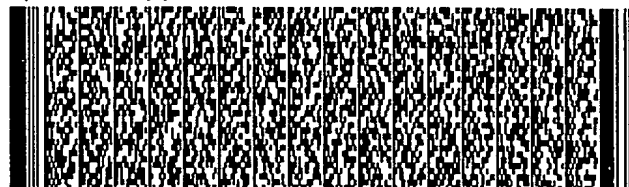
第 4/31 頁



第 4/31 頁



第 5/31 頁



第 5/31 頁



第 6/31 頁



第 6/31 頁



第 7/31 頁



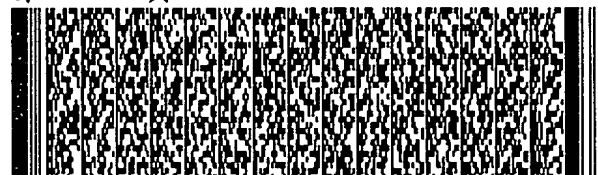
第 7/31 頁



第 8/31 頁



第 8/31 頁



第 9/31 頁



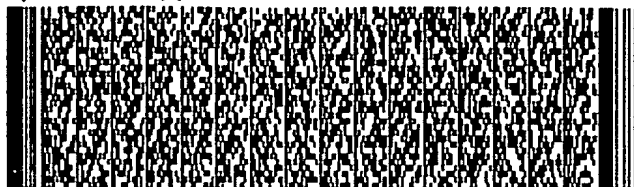
第 9/31 頁



第 10/31 頁



第 10/31 頁



第 11/31 頁



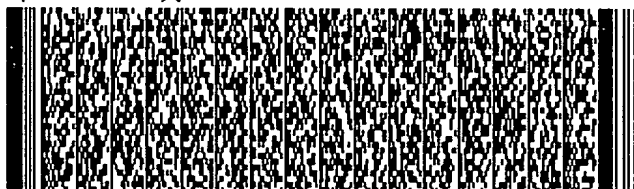
第 11/31 頁



第 12/31 頁



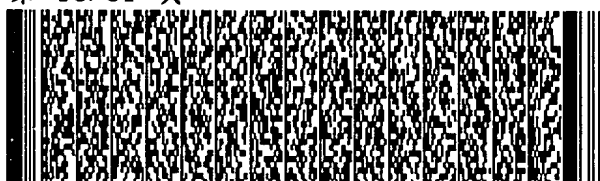
第 12/31 頁



第 13/31 頁



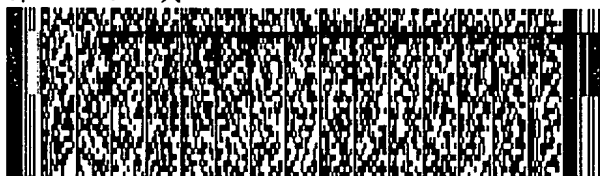
第 13/31 頁



第 14/31 頁



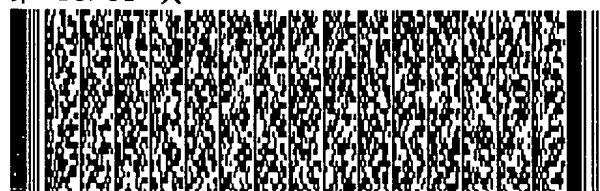
第 14/31 頁



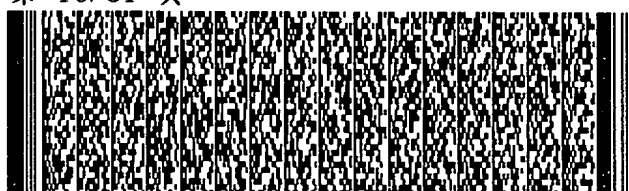
第 15/31 頁



第 15/31 頁



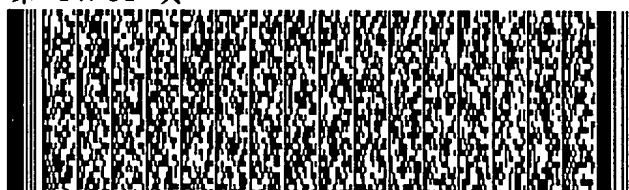
第 16/31 頁



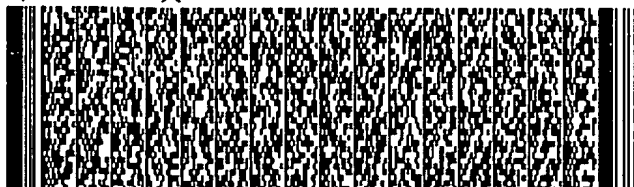
第 16/31 頁



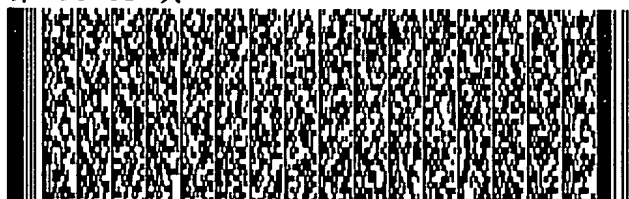
第 17/31 頁



第 17/31 頁



第 18/31 頁



第 18/31 頁



第 19/31 頁



第 20/31 頁



第 22/31 頁



第 24/31 頁



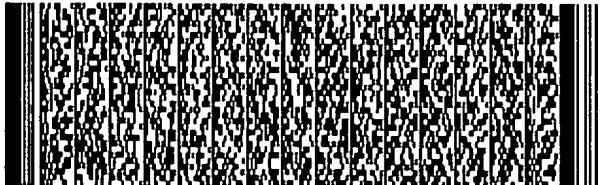
第 26/31 頁



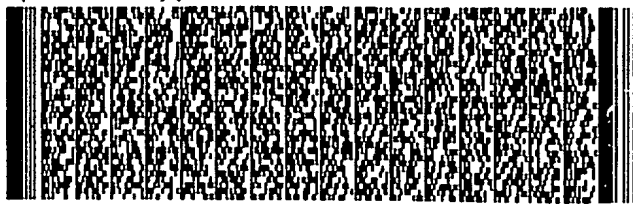
第 28/31 頁



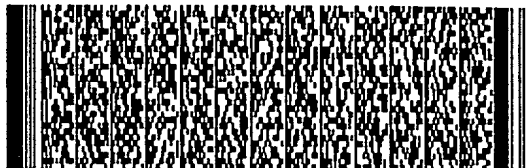
第 30/31 頁



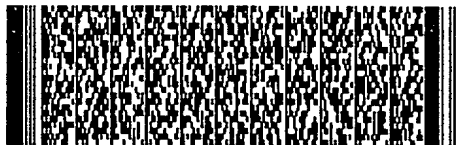
第 19/31 頁



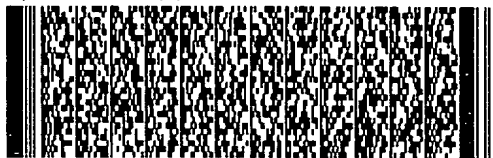
第 20/31 頁



第 21/31 頁



第 23/31 頁



第 25/31 頁



第 27/31 頁



第 29/31 頁



第 31/31 頁

